Dünnschichtchromatographische, histologische und autoradiographische Untersuchungen über die Wirkung von Vitamin E auf den normalen und denervierten Skelettmuskel der Maus

Hans Michael Gaugenrieder

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546018_0079

AUS DER II.MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: Prof.Dr.E.Buchborn

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE, HISTOLOGISCHE UND AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON VITAMIN E AUF DEN NORMALEN UND DENERVIERTEN SKELETTMUSKEL DER MAUS.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hans Michael Gaugenrieder

aus Augsburg

München 1 9 7 1

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.F.MITTELBACH
Mitberichterstatter: Prof.Dr.E.BUCHBORN
Dekan: Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 15.6.1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

M E I N E N E L T E R N

I N D A N K B A R K E I T G E W I D M E T

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 3

1. Fortpflanzung 3

2. Skelettmuskulatur 4

3. Glatte Muskulatur 8

4. Kreislauf 9

II. PROBLEMSTELLUNG 13

IV. METHODIK 14

A Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an Kryostatschnitten 14

B Histologie 2o

C Autoradiographie 23

V. ZUSAMMENFASSUNG 27

VI. LITERATURVERZEICHNIS 28

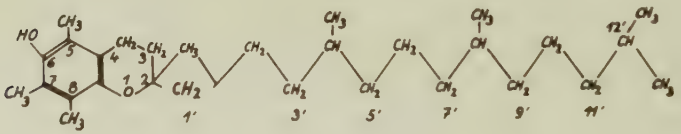
I. E I N L E I T U N G

Die Entdeckung des Vitamin E fällt zeitlich bereits in die Anfänge der Vitaminforschung. EVANS und BISHOP (14) fanden diesen, zunächst "Vitamin X", später dann "Anti-sterilitäts-Vitamin" genannten, notwendigen Bestandteil des Futters bei ihren experimentellen Untersuchungen an Ratten. Die weitere Erforschung von Vitamin E zeitigte als große Erfolge 1936 die Reindarstellung (EVANS, EMERSON und EMERSON) und 1938 die Synthese durch KARRER und ISLER. In der Reindarstellung erschien es als hellgelbe, ölige Flüssigkeit aus Weizenkeimöl, kurz darauf erfolgte die Beschreibung als Tocopherol. Von PENNOCK, HEMMING und KERR (4o) wurde schließlich über vier Tocopherole und vier Tocotrienole, die in der Natur vorkommen, berichtet. Die bis jetzt bekannten, natürlichen Tocopherole (alpha-beta-gamma-delta-Tocopherol) besitzen ebenso wie die verwandten Tocotrienole eine Methylgruppe an C_8. Unter diesen untereinander nah verwandten Substanzen ist D -α- Tocopherol die wichtigste.

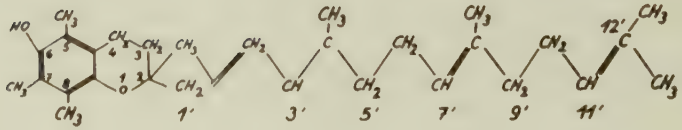
Die biologische Aktivität eine synthetischen DL -α- Tocopherol wurde mit der von D -α- Tocopherol und anderer natürlich vorkommender Tocopherole an verschiedenen Tierspecies verglichen (43). Dabei wurde die Anti-

sterilitäts-Wirkung der Tocopherole an Ratten (15) zur Prüfung verwendet. JOFFE et al. (27) und HARRIS et al. (17,18) fanden unter diesen Bedingungen eine 1,36 mal größere Wirkung von natürlichem D -α- Tocopherol verglichen mit der des synthetischen DL -α- Tocopherol. Auch für andere Vitamin E - Mangelerscheinungen, wie Hämolyse (16), Prophylaxe von Muskeldystrophien (24) und Untersuchungen über erreichbare Tocopherol-Serumwerte ergaben sich fast identische Unterschiede in der Wirksamkeit. Das epimere L -α- Tocopherol zeigt etwa 25% der Wirkung von D -α- Tocopherol.

1.



2.



1. α- Tocopherol

2. α- Tocotrienol

II. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

Die Wichtigkeit des Vitamin E ist nicht so offensichtlich, da im Gegensatz zu anderen fettlöslichen Vitaminen keine Mangelzustände an Kleinkindern sichtbar werden, wie beispielsweise Rachitis bei Vitamin D - Mangel oder Xerophthalmie bei Vitamin A - Defizit. Seit seiner Entdeckung liegt eine Unzahl von Untersuchungen über Vitamin E - Wirkungen an Laboratoriums- wie an Haustieren vor. Der Schwerpunkt dieser Forschung liegt ganz eindeutig auf der Darstellung von Vitamin E - Mangelsymptomen und zeigt das vielleicht breiteste Spektrum an Störungen, die dem Mangel an einem einzelnen Vitamin zugeschrieben werden:

1. Fortpflanzung

   ARSCOTT et al. (1) berichten, daß geschlechtsreife Leghorn-Hähne, die 25 Wochen lang ein Futter bekamen, das viel ungesättigte Fettsäuren, aber kaum Vitamin E enthielt, eine geringere Fertilität und deutlich verminderte Spermatogenese aufwiesen. Nach MEY (31) ist etwa die Hälfte der spontanen Fehlgeburten des ersten Trimenon durch Abortiveier oder Molen bedingt. Da ein Sauerstoffmangel beim Kaninchen zum Zeitpunkt der Implantation eine Abortiveibildung zur Folge

haben kann, wurden Versuche mit einem Vitamin E - Schutz von 20 mg E p h y n a l^{R}/Tag durchgeführt. Die Überlebensrate stieg gegenüber der Kontrollgruppe signifikant, um 15,4%, an. BAYER (3) belegt für fünf verschiedene Indikationsbereiche Erfolge durch Vitamin E - Behandlung bei experimentellen Untersuchungen und klinischer Prüfung. Gefährdung der Schwangerschaft durch Medikamentenbelastung, Virusinfekte, Placentopathien bei Diabetes mellitus und schwere Nephropathien, intrauterine Entwicklungs- und Resistenzschwächen sowie wiederholte Schwangerschaftsverluste durch Ovipathien werden hier in Dosierungen von 100 mg - 20 000 mg Ephynal ^{R}/Tag therapiert.

2. Skelettmuskulatur

Durch Vitamin E - Mangelernährung hervorgerufene Dystrophien des Skelettmuskels stellen wohl die klinisch und experimentell am häufigsten untersuchte Problematik der Vitamin E - Forschung dar. Die üblichen Manifestationen eines schweren Vitamin E - Mangelzustandes (28,35,36) entwickeln sich etwa 2o - 3o Tage nach Beginn der Verfütterung von Mangeldiät. Zu diesen Symptomen gehört eine Veränderung des Verhältnisses Kreatin: Kreatinin im Urin, eine Abnahme des Muskelgewichts und -tonus, ferner

histologisch eine Zerstörung und Nekrose von Muskelfibrillen und eine relative Zunahme der Muskelzellkerne (46). Wenig Zweifel scheint zu bestehen hinsichtlich der Kreatinurie bei Kindern mit zystischer Pankreasfibrose als Folge der niedrigen Tocopherol-Serumwerte (37). BAUMAN et al. (2) berichten über Behandlung erwachsener Patienten mit zystischer Pankreasfibrose, bei denen durch D -α- Tocopherol die Kreatinurie prompt zum Verschwinden gebracht wurde. Bei zehn Patienten mit Muskeldystrophie erproben VESTER et al. (45) eine Kombinationstherapie von Schilddrüsenhormonen und D -α- Tocopherylacetat über einen Zeitraum von 7 Monaten. Sie stellen einen Rückgang der erhöhten CPK-Serumwerte, sogar bis auf Normalwerte, fest; allerdings ist durch die Behandlung keine Zunahme der Muskelkraft zu erzielen. An jungen Versuchstieren ist ein bemerkenswertes Zurückbleiben der Wachstumsrate zu dem Zeitpunkt zu beobachten, an dem die Kreatinurie offensichtlich wird, ein Effekt der von HORWITT (21) durch mehr oder weniger Vitamin E - angereichertes Futter variiert wird.

Die natürlich vorkommende und experimentell hervorgerufene Vitamin E - Mangelsituation führt zu ausgedehnter Muskeldegeneration. Sie zeigt sich bereits sieben Tage nach Beginn der Verfütterung von Mangeldiät, ist allerdings inkonstant bis zum 18.-2o.Tag. Zu diesem Zeitpunkt sind dann lo - 25% der Fasern un-

tergegangen. BINDER und SPIRO (6) entdecken herdförmige Nekrosen im quergestreiften Muskel, mit deutlicher Vakuolisierung und Proliferation der Muskelfaserkerne. Außerdem bestehen beachtliche Unterschiede der Faserquerschnitte. Dabei zeigen die Versuchstiere (Hasen) neben den Degenerationen Beweise für gleichzeitige Regenerationsvorgänge (44). Vitamin E - Beimengung zum Futter läßt derartige Skelettmuskeldegeneration nicht mehr erscheinen.

Auch der Sauerstoffverbrauch des Skelettmuskels ermöglicht Aussagen über seinen Funktionszustand (7).
So ist der Sauerstoffverbrauch des Vitamin E - armen Skelettmuskels deutlich geringer als der eines normal Vitamin E - haltigen. Hier wird zwar von einigen Autoren gegenteilig behauptet, es bestehe eine "Tendenz zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch" durch den dystrophischen Muskel (29). Es erweist sich aber, daß dies im Tierversuch nach 15-tägiger Vitamin E - Mangeldiät richtig, nach 21 und 3o Tagen aber nicht mehr zutreffend ist. Bei Untersuchungen über die Abhängigkeit des Linolensäuregehaltes des Muskels vom Linolensäuregehalt der verabreichten Nahrung, ergibt sich eine proportionale Abhängigkeit (8). Bei höheren Konzentrationen von Linolensäure wird gleichzeitig das Ausmaß der Muskeldystrophie schlimmer. Beifügung von Vitamin E

zur Nahrung verhindert zwar das Entstehen der Muskeldystrophie, ändert aber nichts an der Menge der Linolensäure, die in die Muskellipide aufgenommen wird.

Beim chronischen, meist progressiven Verlauf vieler Myopathien mit seinen fast unlösbaren therapeutischen Problemen, stellt die Vitamin E - Behandlung einen der Versuche, wenigstens bescheidene Besserungen zu erreichen, dar (4). Das antioxydative Vitamin E stabilisiert lipoidhaltige Membranen und bildet auf hydrophilen Oberflächen monomolekulare Filme. Aus dieser membranabdichtenden Wirkung mit einer daraus folgenden Verminderung der Kreatinurie, ergibt sich nach Mittelbach et al. (32) eine Berechtigung der Gabe von Vitamin E, falls hoch genug dosiert wird, d.h. mindestens 3oo mg/Tag. Der regulierende Einfluss von Vitamin E auf die Phosphorylierungsprozesse im dystrophischen Muskel und seine Rolle bei der Atmungskettenphosphorylierung gelten ebenfalls als gesichert. In einer Aufstellung von BECKMANN (5) wird auch auf eine Reihe von möglichen Ursachen für das Versagen der Vitamin E - Therapie eingegangen: Bereits vorhandene irreversible Muskelschäden erlauben keine vollständige Regeneration. Die Dosierung genügt oftmals nicht, einen Serumtocopherol-Gehalt von 12oo - 2ooo Gammaprozent

zu erreichen. Infolge von Konstitutionsanomalien ist der Vitamin E - Bedarf manchmal besonders hoch. Das Vitamin E - Defizit kann infolge unbekannter funktioneller und anatomischer Veränderungen von Magen, Darm, Leber oder Pankreas besonders schwer auszugleichen sein. Ungesättigte Fettsäuren oder deren Peroxyde in Lebertran, Fischöl, Sonnenblumenöl usw. stellen eine oftmals nicht zu ermittelnde Menge an sogenannten Anti - E - Vitaminen dar.

3. Glatte Muskulatur

Da die Wirkungen von Vitamin E auf den Uterus bekannt sind, hat sich CLEMENTI (1o) eingehend mit Elektronen-mikroskopischen Untersuchungen über den Effekt auf die Uterus-Muskelzelle befaßt. Dabei mag das Dickenwachstum der Muskelschicht abhängig sein entweder indirekt von einer Verbesserung der Blutzufuhr und damit von besseren Versorgungsbedingungen oder direkt von einer Vitamin E - Wirkung auf den Stoffwechsel der Muskelzelle. Die Versuche wurden an ovarektomierten Hasen ausgeführt, wobei die mit Vitamin E behandelte Gruppe der Versuchstiere 2o Tage lang mit einer Dosis von 6o mg/Tag subkutan gespritzt wurde. Die Uterusmuskulatur der behandelten Tiere zeigte dabei sowohl makroskopisch

als auch mikroskopisch deutliche Unterschiede: Unter Vitamin E ist die Muskelschicht verbreitert und zwar in einem sichtbaren Ausmaß.

4. Kreislauf

Exsudative Diathese, Hämorrhagien, Anämien und Encephalomalacien stellen sich nach Verfütterung einer genau abgestimmten polyensäurereichen Diät bei gleichzeitigem Vitamin E - Mangel mit großer Regelmäßigkeit ein. Der Bedarf an Vitamin E ist weniger von der Menge der jeweiligen mitverfütterten ungesättigten Fettsäuren als vielmehr vom Grad der Ungesättigtheit, d.h. von der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül abhängig.

Von ROSE und GYÖRGY (42) wurde folgender in vitro-Hämolysetest entwickelt: Werden Ratten ohne Vitamin E ernährt und werden Erythrocyten solcher Ratten in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und anschließend mit einer Dialursäurelösung behandelt, so kommt es zu einer hämolytischen Reaktion. Wird den Tieren jedoch vor der Dialursäurebehandlung Vitamin E verabreicht, so bleibt die Hämolyse je nach Konzentration der angewendeten Substanz ganz oder teilweise aus. Es wurde auch die Beziehung zwischen Spontanhämolyse in vitro und

dem Vitamin E - Gehalt der Nahrung untersucht (25). Männliche Ratten erhielten eine Speckdiät mit zunehmendem Vitamin E - Gehalt. Erst ab einer bestimmten Vitamin E - Dosis (19 I.U./kg) konnte die Hämolyse verhindert werden, bei geringerer Dosierung ergaben sich keine klaren Aussagen bezüglich eines Einflusses. Der Ablauf der Hämolyse ist ungeklärt, erscheint jedoch eng verbunden zu sein mit der wohlbekannten antioxydativen Wirkung des Tocopherol. Während eines Vitamin E - Mangels treten vermehrt Lipoperoxide in den Membranen der roten Blutkörperchen auf, verbinden sich unter Umständen mit Sulfhydrylgruppen und zerstören sie.

Anämie, die mit Veränderung des Knochenmarks und erhöhtem Nukleinsäurestoffwechsel in Verbindung steht, ist in Untersuchungen von DINNING (12) bei Affen als Folge eines Vitamin E - Mangels bewiesen. Eine makrocytäre Anämie, die durch Behandlung mit Vitamin E aufgehoben werden kann, wurde bei unterernährten Kindern in Jordanien nachgewiesen (3o).

Die exsudative Diathese äußert sich durch Austreten von Blutplasma, vorzugsweise durch die Kapillaren des subkutanen Fettgewebes. In der

Initialphase ist das affizierte Gewebe meist hyperämisch bzw. diffus hämorrhagisch. Die Exsudation von größeren Mengen an Plasma führt zur Erniedrigung des Verhältnisses von Albumin zu Globulin im intravaskulären Blut. Zur Erzeugung der exsudativen Diathesen wurden Diäten verwendet, die statt Vitamin E Casein und Dorschlebertran enthielten (11).

Encephalomalacie wird beim Küken durch eine Vitamin E - defiziente Nahrung, die außerdem Polyensäuren enthält, hervorgerufen (39). Die Histologie des Kleinhirns zeigt Hämorrhagie und Ödem, die sowohl in der Granularschicht als auch in der Molekularschicht vorkommen können, und außerdem Schwund der Purkinje-Zellen. Während Vitamin E die Encephalomalacie vollständig verhindern kann, zeigen etliche unphysiologische Antioxydentien (in größerer Dosis) fast dieselbe Wirkung.

Vitamin E - Mangel, im Experiment sicher zu erzeugen, führt bei den verschiedenen Species von Laboratoriums- (Versuchs-) tieren zu sehr unterschiedlichen klinischen und pathologisch-anatomischen Krankheitsbildern. Beim Menschen dagegen, ohne wesentliche Experimentiermöglichkeit, ist der Vitamincharakter des Tocopherol noch nicht klargestellt.

Die längsten und ausführlichsten Beobachtungen am Menschen stammen sicherlich von HORWITT (22) und Mitarbeitern. Kriterien einer unzureichenden Vitamin E - Versorgung sind dort niedere Plasmawerte von Tocopherol und eine erhöhte Hämolysebereitschaft der Erythorcyten in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd. Die Versuchsdiät enthält etwa 3 mg D - alpha - Tocopherol pro Tag, dabei erscheinen die oben genannten Symptome langsam, sie treten aber beschleunigt auf, wenn die Zufuhr von Polyensäuren, besonders von Linolensäure, gesteigert wird. Wie DINNING (13) stellt HORWITT (23) unter langdauernder Vitamin E - Mangeldiät eine verkürzte Lebensdauer menschlicher Erythrocyten fest, bei darauffolgender Therapie von 3oo mg D-alpha-Tocopherol pro Tag steigt die Anzahl der Reticulocyten zwar nicht sehr stark aber signifikant. Als Ursache für ein Vitamin E - Defizit kommt beim Menschen nur eine Malabsorption in Frage (2o). Untersuchungen großer Bevölkerungsgruppen durch HARRIS et al. (19) ergeben, daß 7% der untersuchten Personen einen Vitamin E - Mangel aufweisen, wenn man vom Plasma-Tocopherolwert ausgeht. Die Schwierigkeit liegt allerdings darin, zu entscheiden, welcher Vitamin E - Spiegel als ausreichend anzusehen ist, da eine Gewißheit über "suboptimale Vitamin E - Versorgung" nicht besteht.

III. P R O B L E M S T E L L U N G

Da unter den verschiedensten Indikationen Vitamin E therapeutisch verwendet wird, die Dosierungen im einzelnen aber um mehr als eine Zehnerpotenz schwanken, soll in der vorliegenden Arbeit der einfache Nachweis einer direkten Aufnahme in die einzelnen Organe durch die Dünnschichtchromatographie (A) , die Wirkung auf Skelettmuskel-Faserquerschnitte durch die Histologie (B) und die Muskelzellkernaktivierung durch die Autoradiographie (C) erbracht werden.

IV. METHODIK

A Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an Kryostatschnitten.

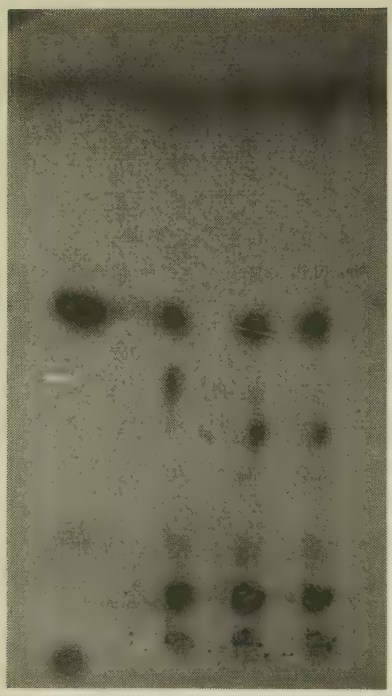
Material und Methode:

12 männliche Albinomäuse, Gewicht durchschnittlich 25 g, erhielten 2 Wochen lang 100 mg Ephynal ^{R} pro Tag subcutan. Nach dieser Behandlung wurden die Tiere getötet; bei der makroskopischen Betrachtung der Versuchstiere ergaben sich teils äußerst stark ausgeprägte perimysiale Bindegewebssäcke, teils Abszesse mit starker Proliferation von Granulationsgewebe. Entnommen wurden m.rectus femoris, m.gastrocnemius, Herz, Leber, Milz, Niere und Fettgewebe. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Gewebsstücke in flüssigem Stickstoff (- 195° C) eingefroren und luftdicht bei - 60° C in der Kühltruhe aufbewahrt.

Die Dünnschichtchromatographie wurde genau nach der von MITTELBACH und HAMBURGER (33) angegebenen Methode durchgeführt. Im Kryostaten wurden 40 μ dicke Gewebsschnitte hergestellt und je nach Art des Materials 4 oder 5 Schnitte am unteren Rand der Trägerplatte fixiert. Nach etwa 5 Minuten

- die Schnitte müssen auf der Platte antrocknen - wurde mit Kieselgel G (Fa.E.MERCK, Darmstadt) in einer Dicke von 250 µ beschichtet. Darnach wurde die beschichtete Platte 20 Min. kalt und 15 Min. warm getrocknet. Das als Vergleichssubstanz mitlaufende Ephynal ^{R} wurde in gleicher Höhe neben den Gewebsschnitten auf der bereits beschichteten Platte mit einer automatischen Mikropipette (0,025 ml) aufgetropft; was durch vorhergehende Verdünnung eine Menge von 0,0025 mg ergab.

Die Trennung des Vitamin E von den neutralen Lipiden gelang am besten mit einer "Stufentechnik". In Stufe I wurde die Platte zunächst bis auf eine Steighöhe von 8 cm entwickelt, dann 5 Min.getrocknet und anschließend 16 cm im selben Fließmittel entwickelt; bei Zimmertemperatur wurde eine optimale Kammersättigung durch Auskleiden der beiden langen Seiten des rechteckigen Glastroges mit Filterpapier erreicht. Als Fließmittel wurde ein Petroläther - Diäthyläther - Eisessig - Gemisch (Mischungsverhältnis 90:10:1) verwendet. Im normalen Farbnachweis bewährte sich Phosphormolybdänsäure, im Fluoreszenznachweis unter langwelligem UV-Licht (350 µ) 2' 7' - Dichlorfluorescein. (Abb.1,2).



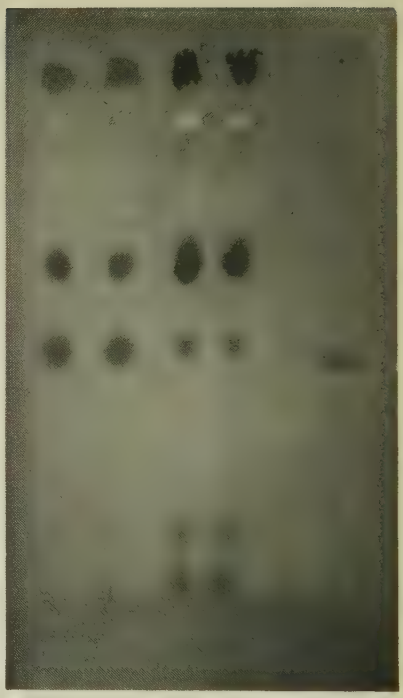


Abb.1

Darstellung von Vitamin E
aus dem Skelettmuskel

Sprühreagenz: Phosphormolybdänsäure
v.l.n.r.aufgetragen:
Reinsubstanz Ephynal^{R} 0,0025 mg
m.rectus femoris
m.gastrocnemius
m.gastrocnemius

Abb.2

Darstellung von Vitamin E aus der
Skelettmuskel

Sprühreagenz: 2', 7' Dichlorfluorescein
UV-Licht 350 µ
v.l.n.r.aufgetragen:
Reinsubstanz Ephynal^{R} 0,0025 mg
m.gastrocnemius
m.gastrocnemius
m.rectus femoris
m.rectus femoris

Ergebnisse:

Bei den Versuchstieren, die mindestens 10 Dosen von 100 mg Ephynal s.c. appliziert bekommen hatten, ließ sich in der Dünnschichtchromatographie auf derselben Steighöhe wie die zur Probe mitgelaufene Reinsubstanz, über den neutralen Lipiden, eine deutlich dargestellte weitere Fraktion nachweisen. Sie erschien nicht bei Kontrolltieren ohne Medikation. Zur Kontrolle ihrer weiteren Auftrennbarkeit wurden unter UV-Licht erscheinende Flecken dieser Fraktion sorgfältig abgekratzt und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Äthanol gegeben. Der Überstand nach 15 Min. Zentrifugieren bei 3 000 V.p.m. wurde in derselben Weise wie die Reinsubstanz auf einer weiteren beschichteten Platte gegen Ephynal ^{R} aufgetragen. Es zeigte sich unter erneuter Anwendung der Stufentechnik keine weitere Auftrennung des Eluates, auch der Rf-Wert stimmte mit dem der Reinsubstanz Ephynal ^{R} überein. (Abb.3)

Abb.3

Versuch der weiteren Auftrennbarkeit von Vitamin E - Fraktionen aus den vorhergehenden Versuchen

Sprühreagenz: Phosphormolybdänsäure

v.l.n.r.aufgetragen:

0,025 ml Eluat aus Vitamin E - Fraktionen des Skelettmuskels
0,025 ml Eluat aus Vitamin E - Fraktionen des Skelettmuskels
0,025 ml Eluat aus Vitamin E - Fraktionen des Skelettmuskels

0,025 ml Reinsubstanz Ephynal ^{R} (0,0025 mg)

Diskussion:

Die injizierten Mengen an Vitamin E, 100 mg pro Tag, erscheinen in Relation zum Körpergewicht zunächst sehr hoch. Es ist aber zu beachten, daß die Vitamin E - Therapie beim Menschen unter den verschiedensten Indikationen monate-, sogar jahrelang durchgeführt wird. Aus der Literatur ergibt sich außerdem für die Dosierung ein recht weiter Spielraum, innerhalb dessen Tocopherole verordnet werden. Die dabei erreichten Gewebsspiegel im Skelettmuskel dürfen demnach mit denen unserer Versuchstiere rein rechnerisch sehr wohl verglichen werden.

Die Dünnschichtchromatographie des direkt aufgetragenen Gewebes erlaubt also unter einfachen Laborbedingungen den qualitativen Nachweis des aufgenommenen Vitamin E. Mit entsprechend genauem Vorgehen ist, vor allem im Fluoreszenznachweis mit Dichlorfluorescein, sogar eine semiquantitative Bestimmung möglich.

Das Verfahren eignet sich deshalb vor allem aus zwei Gründen zum Nachweis der Resorption von Vitamin E: Der Arbeitsaufwand ist durch Verzicht auf langwierige Homogenisierung und auf Extraktionsverfahren gering. Die Menge des benötigten Gewebes

ist so unbedeutend, daß wertvolles Biopsiematerial für anderweitige Untersuchungen erhalten bleibt.

B Histologie

Material und Methode:

40 männliche Albinomäuse wurden in folgenden Gruppen zu 10 Tieren aufgeteilt:

Gruppe I: sorgfältige Durchtrennung des n. ischiadicus der rechten unteren Extremität; danach s.c. Injektionen von jeweils 50 mg Ephynal ^{R} verteilt über einen Zeitraum von 8 Wochen.

Gruppe II: Keine Denervierung, 16 s.c.Injektionen von jeweils 50 mg Ephynal ^{R}, verteilt über 8 Wochen.

Gruppe III: Durchtrennung des n.ischiadicus der rechten unteren Extremität, keine Medikation.

Gruppe IV: Keine Denervierung, keine Medikation.

Die Tiere der Gruppen I - IV wurden nach Ablauf der achtwöchigen Vorbereitung getötet. Anschliessend wurden sofort jeweils der m.gastrocnemius und m.rectus femoris der rechten unteren Extremität entnommen. Das Muskelmaterial wurde sodann in Kunststoff eingebettet, nach der Methode von HIRSCH, 4 µ dick geschnitten und H.E. gefärbt.

Aus jeder Gruppe (I - IV) wurden zur statistischen Erfassung von 1000 Muskelfaserquerschnitten des m.gastrocnemius insgesamt vier mikrokopische Präparate von verschiedenen Versuchstieren verwendet. Bei einer 400-fachen Gesamtvergrößerung wurde mit Hilfe des Okularmikrometers aus dem arithmetischen Mittel des größten und kleinsten Durchmessers die Stärke der einzelnen Muskelfaser bestimmt.

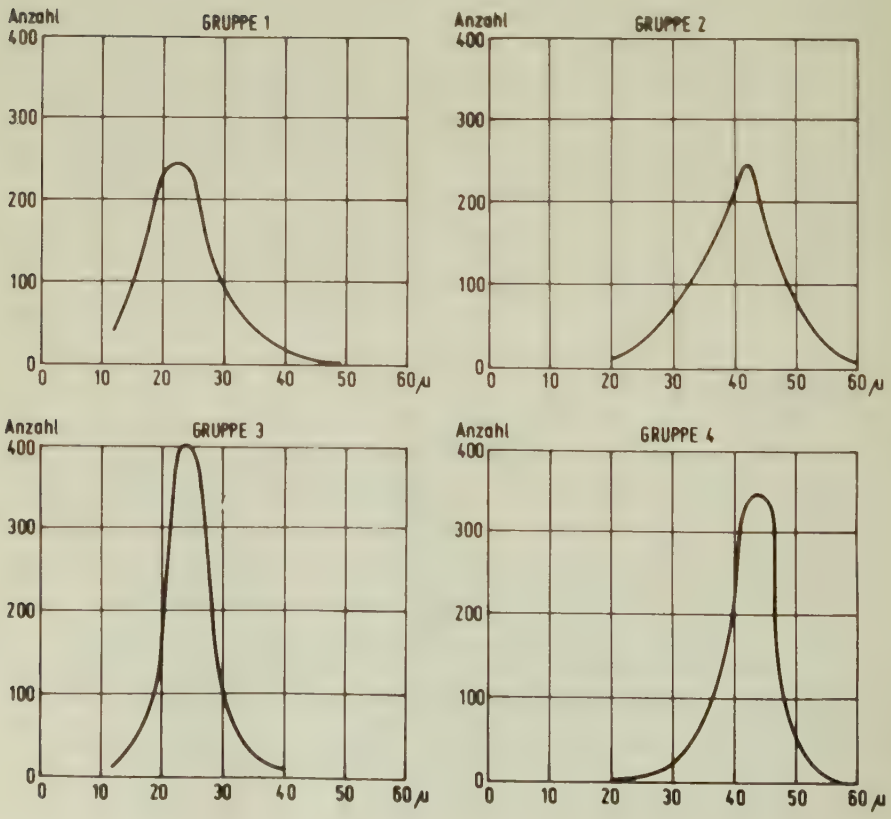
Ergebnisse:

Die Auftragung der verschiedenen Faserquerschnitte nach ihrer Häufigkeit im Koordinatensystem ergibt für die Gruppen I und II, beide mit Ephynal ^{R}, einen flacheren Kurvenverlauf. Das bedeutet eine relative Zunahme sowohl besonders dünner als auch besonders dicker Fasern gegenüber den Kurven mit deutlicherem Maximum, die aus den Gruppen III und

IV erstellbar sind. Die Maxima der Querschnitte liegen bei etwa 25 µ nach Denervierung (Gruppe I und III) und 40 µ beim normal innervierten Muskel (Gruppe II und IV).

Abb.4

Häufigkeit der Faserquerschnitte bei je 1000 betrachteten Fasern der Gruppen I - IV.



Diskussion:

Aus der Abb.4 wird offensichtlich, daß Vitamin E die als Folge der Denervierung auftretende Atrophie des Skelettmuskels nicht entscheidend zu bessern vermag. Die aus dem Kurvenverlauf ersichtliche Wirkung des Tocopherols könnte darin bestehen, daß nach Denervierung wie auch beim normalen Muskel die Anzahl der unterdurchschnittlich dünnen Fasern kleiner und die der überdurchschnittlich dicken Fasern größer wird. Dieser eher etwas unklare Laborbefund deckt sich mit den bislang kaum objektivierbaren Ergebnissen der Vitamin E - Therapie bei Myopathien verschiedener Genese.

C Autoradiographie

Material und Methode:

Von den zur Histologie (B) verwendeten Tieren der Gruppen I - IV wurden je zwei 1 Stunde ante finem nach einer intraperitonealen Injektion von H^3-Thymidin abgesondert. Die Gesamtaktivität der verabfolgten Tracer-Substanz betrug pro Tier 100 Mikrocurie,

was etwa 4 Mikrocurie pro Gramm Körpergewicht entspricht. Die postmortal entnommenen Muskeln, m.gastrocnemius, wurden in gleicher Weise wie unter B beschrieben eingebettet, geschnitten und gefärbt. Die sorgfältig gereinigten Objektträger wurden dabei nach der Methode von MITTELBACH und HUSCH (34) mit Eiweiß-Glyzerin als Bindemittel beschichtet.

Die autoradiographische Technik, es wurde Ilford K 5 ^{R} - Emulsion verwendet, ist weitestgehend bei CARO, PRESCOTT und OEHLERT (9, 41, 38) beschrieben.

Exponiert wurde 14 Tage lang im Dunkeln bei einer Temperatur von 5^{o} C, danach kamen ID 19 - Entwickler und die üblichen Fixiermittel zur Anwendung. Aus jeder der vier Gruppen wurden unter dem Mikroskop 50.000 Muskelzellkerne auf eventuelle Markierung durch aufgenommenes H^{3} - Thymidin beobachtet. Zehn oder mehr Silberkörner pro Muskelzellkern galten als Kriterium für eine Aktivität des Thymidin.

Ergebnisse:

Die durch Silberkörner deutlich markierten Zellkerne verteilen sich folgendermaßen, bei Betrachtung einer Gesamtzahl von 50.000 pro Gruppe.

Abb.5

	aktivierte Kerne	Gesamtzahl d. betr. Kerne
GRUPPE 1	16	50 000
GRUPPE 2	20	50 000
GRUPPE 3	3	50 000
GRUPPE 4	3	50 000

Gruppe 1: Denervierung +, Ephynal ^{R} +
Gruppe 2: Denervierung -, Ephynal ^{R} +
Gruppe 3: Denervierung +, Ephynal ^{R} -
Gruppe 4: Denervierung -, Ephynal ^{R} -

Diskussion:

Die Zahlen der obigen Tabelle scheinen für eine Aktivierung des Kernstoffwechsels der Muskelzelle nach Vitamin E - Gaben zu sprechen. Beim Vergleich des hier untersuchten Materials ergab sich immerhin eine etwa fünffache Anzahl an Kernen, die unter Vitamin E den Tracer H^3 - Thymidin einbauten. Auch der Unterschied zu den Ergebnissen von Versuchen bei JERUSALEM et al. (26), in deren Verlauf auch der Normalmuskel beobachtet wurde, macht eine Tocopherol-Wirkung wahrscheinlich. Daß bei unseren Versuchen die Gruppe ohne Denervation eine noch etwas höhere Zahl feststellen ließ, gestattet bei den relativ geringen Zahlen und einer Methode, die eine willkürliche Grenze zwischen "aktivem" und "inaktivem" Kern zieht, keine Unterscheidung der Kernstoffwechselaktivierung im normalen oder denervierten Skelettmuskel.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es wird über Untersuchungen und Ergebnisse mit Vitamin E an Hand der vorliegenden Literatur berichtet.

2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen, bisher vor allem zur Analyse des Lipidmusters herangezogen, erlauben darüber hinaus auch den Nachweis exogen zugeführter Substanzen. Von dieser Möglichkeit wird Gebrauch gemacht, um die Speicherung von experimentell zugeführtem Vitamin E im Skelettmuskel zu belegen.

3. Histologische Untersuchungen nach experimenteller Vitamin E - Therapie ergeben weder für den normalen noch für den denervierten Skelettmuskel der Maus Auffälligkeiten. Myometrisch zeigt sich eine leichte Abflachung der Verteilungskurve ohne sichere Verschiebung.

4. Autoradiographische Untersuchungen geben Hinweise auf eine Kernaktivierung nach Vitamin E - Therapie.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 ARSCOTT, G.H., PARKER, J.E.

Effectiveness of Vitamin E in reversing sterility of male chickens fed a diet high in linoleic acid.

J.Nutr. 91: 219 - 22, 1967

2 BAUMAN, M.B., DIMASE, J.D., OSKI, F., SENIOR,J.R.

Brown bowel and skeletal myopathy associated with Vitamin E depletion in pancreatic insufficiency.

Gastroenterology 54: 93 - 1oo, 1968

3 BAYER, R.

Indikationen einer Vitamin E - Behandlung bei bedrohten Schwangerschaften.

Arch.Gynäck. 2o4: 249 - 5o, 1967

4 BECKMANN, R. von OSTEN, V.

Therapeutische Möglichkeiten bei progressiver Muskeldystrophie.

Deutsch.Med.Wschr. 91: 1o8 - 16, 1966

5 BECKMANN, R.

Erfahrungen und Vorstellungen zur Therapie der progressiven Muskeldystrophien.

Hippokrates 39: 876 - 88, 1968

6 BINDER, H.J., SPIRO, H.M.

Tocopherol deficiency in man.

Amer.J.Clin.Nutr. 2o: 594 - 6o3, 1967

7 BIRD, J.W., SCHOTTELIUS, D.D., SCHOTTELIUS, B.A.
Oxygen consumption of soleus muscles from normal, vitamin E-supplemented, and vitamin E-deficient guinea-pigs during rest and stimulation.
Metabolism 12: 57o - 5, 1963

8 CALVERT, C.C., DESAI, I.D., SCOTT, M.L.
Effect of linoleic acid on nutritional muscular dystrophy in the chick.
J.Nutr. 83: 3o7 - 13, 1964

9 CARO, L.G.
High resolution autoradiography
Academic Press, New York, London
Band 1: 327 - 63, 1964

10 CLEMENTI, F.
Electron microscope observations on the action of vitamin E on the uterine smooth muscle cells.
Experientia 18: 4o6 - 7, 1962

11 DAM, H., GLAVIND, J.
Alimentary exudative diathesis
Nature 142: 1o77 - 8, 1938

12 DINNING, J.S.
Nucleic acid metabolism in vitamin E deficiency.
Vitamins and Hormones 20: 511 - 19, 1962

13 DINNING, J.S., MARVIN, H.N., DAY, P.L.
Erythrocyte survival in vitamin E-deficient monkeys.
Proc.Soc.Exper.Biol. and Med. 1o5: 473, 196o

14 EVANS, H.M., BISHOP, K.S.
On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction.
Science 56: 65o, 1922

15 EVANS, H.M., BURR, G.O.
The antisterility vitamine fat soluble E.
Memoirs University of California 8: 1, 1927

16 FRIEDMANN, L. WEISS, W., WHERRY, F., KLINE, O.L.
Bioassay of vitamin E by the dialuric acid hemolysis method.
J.Nutr. 65: 143, 1958

17 HARRIS, P.L., LUDWIG, M.I.
Relative vitamin E potency of natural and of synthetic alpha-tocopherol.
J.Biol.Chem. 179: 1111, 1949

18 HARRIS, P.L., LUDWIG, M.I.
Vitamin E potency of alpha-tocopherol and alpha-tocopherol esters.
J.Biol.Chem. 18o: 611, 1949

19 HARRIS, P.L., HARDENBROOK, E.G., DEAN, F.P.
CUSACK, E.R., JENSEN, J.L.
Blood tocopherol values in normal human adults and incidence of vitamin E deficiency.
Proc.Soc.Exper.Biol.and Med. 1o7: 381, 1961

20 HERTING, D.C.
Perspective on vitamin E
Amer.J.Clin.Nutr. 19: 21o - 8, 1966

21 HORWITT, M.K.

Role of vitamin E, selenium, and polyunsaturated fatty acide in clinical and experimental muscle desease.

Fed.Proc. 24: 68 - 72, 1965

22 HORWITT, M.K.

Vitamin E in human nutrtion-an interpretative review.

Borden's Rev. Nutr. Res. 22: 1, 1961

23 HORWITT, M.K., CENTURY, B., ZEMAN, A.A.

Erythrocyte survival time and reticulocyte levels after tocopherol depletion in man.

Amer.J.Clin.Nutr. 12: 99, 1963

24 HOVE, E.L., HARRIS, P.L.

Relative activity of the tocopherole in curing muscular dystrophy in rabbits.

J.Nutr. 33: 95, 1947

25 JAGER, F.C.

Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro.

Nutr.Dieta 10: 215 - 23, 1968

26 JERUSALEM, F., LESCH, R., NOETZEL, H.

Autoradiographische Untersuchungen über die Regeneration am denervierten Rattenmuskel.

Dt.Zeitschrift für Nervenheilkunde 194: 128 - 41, 1968

27 JOFFE, M., HARRIS, P.L.

The biological potency of the natural tocopherols and certain derivatives.

J.Amer.Chem.Soc. 65: 925, 1943

28 MACKENZIE, C.G., McCOLLUM, E.B.

The cure of nutritional muscular dystrophy in the rabbit by alpha-tocopherol and its effects on creatine metabolism.

J.Nutr. 19: 345 - 62, 194o

29 MADSEN, L.L.

The comparative effects of cod liver oil concentrate, and cottonseed oil in a synthetic diet on the development of nutritional dystrophy.

J.Nutr. 11: 471, 1936

30 MAJAJ, A.S., DINNING, J.S., AZZAM, S.A.
DARBY, W.J.

Vitamin E responsive megaloblastic anaemia in infants with protein-calorie malnutrition.

Am.J.Clin.Nutr. 12: 374, 1963

31 MEY, R.

Zur Prophylaxe der Abortiveier mit Vitamin E.

Wien.Med.Wschr. 113: 156 - 7, 1963

32 MITTELBACH, F., BODECHTEL, G.

Zur Therapie der Muskelkrankheiten.

Münch.Med.Wschr. 36: 1988 - 93, 1968

33 MITTELBACH, F., HAMBURGER, S.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an Kryostatschnitten.

Z.Ges.Exp.Med. 152: 71 - 8o, 1969

34 MITTELBACH, F., HUSCH, L.

unveröffentlicht

35 MORGULIS, S., SPENCER, H.C.

Metabolism studies in nutritional muscular dystrophy.

J.Nutr. 12: 191 - 2o4, 1936

36 NICHOALDS, G.E., DIEHL, J.F., FITCH, C.D.

Vitamin E deficiency and metabolism of amino acid in skeletal muscle.

37 NITOWSKY, H.M., GORDON, H.H., TILDON, J.T.

Studies of tocopherol deficiency in infants and children. IV. Effect of alpha tocopherol on creatinuria in patients with cystic fibrosis of pancreas an biliary atresia.

Bull.Hopkins, Hosp.98: 361 - 71, 1956

38 OEHLERT, W.

Durchführung und Anwendungsmöglichkeiten der autoradiographischen Methode in der Pathologie.

Schweiz.Med.Wschr. 94: 1oo9, 1964

39 PAPPENHEIMER, A.

A cerebellar disorder in chicks, apparently of nutritional disorder.

J.Exp.Med. 53: 11 - 26, 1931

40 PENNOCK, J.F., HEMMING, F.W., KERR, J.D.

A reassessment of tocopherol chemistry.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 17: 542 - 8,1964

41 PRESCOTT, D.M.

Autoradiography with liquid emulsion.

Academic Press, New York, London
Band 1: 365 - 7o, 1964

42 ROSE, C.S., GYÖRGY, P.

Tocopherol requirements of rats by means of the haemolysis test.

Proc.Soc. Exp.Biol. 74: 411 - 15, 195o

43 SCOTT, M.L., DESAI, I.D.

The relative anti-muscular dystrophy activity of the d - and l - epimers of alpha - tocopherol and of other tocopherols in the chick.

J.Nutr. 83: 39 - 43, 1964

44 VAN VLEET, J.F., HALL, B.V., SIMON, J.

Vitamin E deficiency: a sequential study by means of light an electron microscopy of the alterations occuring in regeneration of skeletal muscle of affected weanling rabbits.

Amer.J.Path. 51: 815 - 3o, 1967
52:1o67 - 79, 1968

45 VESTER, J.W., BALCERZAK, S.P.,

NARDUZZI, J.V., DANOWSKI, T.S.

Hydrocortisone and/or dessicated thyroid in physiologic dosage. XIX. Muscular dystrophy: creatine phosphokinase during thyroid and alpha-tocopheryl acetate therapy.

Metabolism 15: 971 - 9, 1966

46 YOUNG, J.M., DINNING, J.S.

A relationship of vitamin E to nucleic acid metabolism.

J.Biol.Chem. 193: 743 - 7, 1951

Herrn Prof. Dr.med. F.MITTELBACH
danke ich sehr herzlich für die
Überlassung des Themas und für die
großzügige Unterstützung bei der
Ausarbeitung.

L E B E N S L A U F

Am 15.November 1945 wurde ich als Sohn des Gerichtsassessors Dr.jur.Hans Gaugenrieder und seiner Frau Agnes, geb. Reiber in Augsburg geboren. Von 1951 bis 1955 besuchte ich in Augsburg die Volksschule und anschließend das Humanistische Gymnasium bei St.Stephan in Augsburg. Im Juni 1965 legte ich die Reifeprüfung am Gymnasium der Zisterzienser in Bregenz-Mehrerau ab.

Das Studium der Medizin begann ich mit dem Wintersemester 1965/66 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier legte ich nach fünf vorklinischen Semestern im Februar 1968 das Physikum ab.

Mein Studium beendete ich mit dem medizinischen Staatsexamen im Juni 1971.